

10/506862

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



10 Rec'd PCT/ATC 02 SEP 2004  
REC'D 25 APR 2003  
WIPO PCT

EPO - DG 1

14. 04. 2003

96

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 102 09 744.5

**Anmeldetag:** 06. März 2002

**Anmelder/Inhaber:** Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der  
angewandten Forschung e.V., München/DE

**Bezeichnung:** Modifizierte oxidische Nanopartikel mit hydrophoben  
Einschlüssen, Verfahren zu ihrer Herstellung und  
Verwendung

**IPC:** C 09 C, C 08 K, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 19. März 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Wallner

## Erfindungsmeldung

### Modifizierte oxidische Nanopartikel mit hydrophoben Einschlüssen, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung

#### 1. Stand der Technik

Latexpartikel sind hydrophob und als Host für hydrophobe Moleküle sehr geeignet und im Einsatz [1]. Silicatpartikel sind naturgemäß hydrophil und eignen sich daher nicht als Host für hydrophobe Moleküle. Zwar sind fluorhaltige Beschichtungen auf  $\text{SiO}_2$ -Basis bekannt (Lotus-Effekt, Easy to clean Oberflächen, Brechzahlanpassung – [2]); aber aufgrund des schnellen Vergelens bei der Partikelherstellung mit Fluoralkyltrialkoxysilanen sind noch keine Silicatpartikel synthetisiert worden. Diese wären jedoch wünschenswert damit hydrophobe Moleküle auch in  $\text{SiO}_2$ -Partikel eingeschlossen werden können.

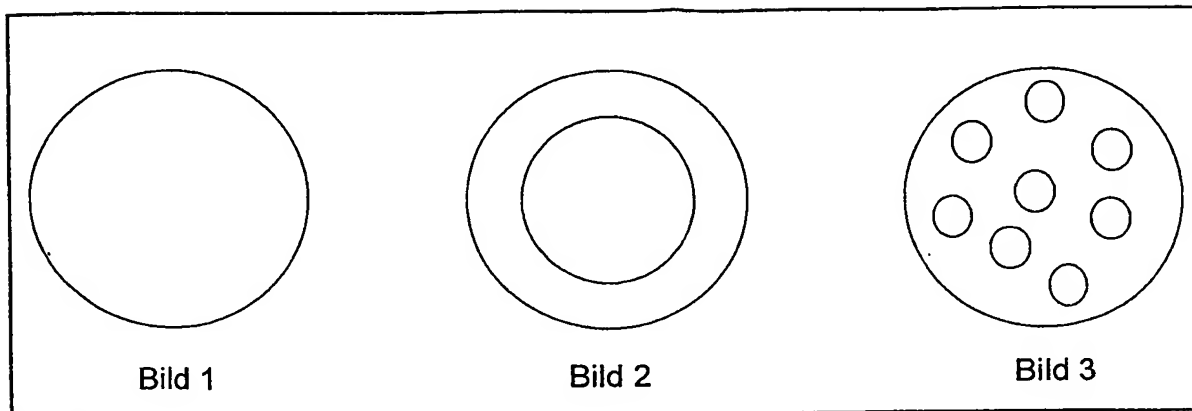
Deshalb war es Ziel der Erfindung Silicatpartikel mit Fluororganyl- und / oder Arylalkoxysilanen so zu modifizieren, dass Komplexe oder organische Farbstoffe, die in hydrophoben Medien beste spektroskopische Eigenschaften besitzen, in  $\text{SiO}_2$ -Partikel einzubinden sind und dort ihre guten spektroskopischen Eigenschaften beibehalten. Dies könnte beispielsweise für medizinische, biochemische oder optische Anwendungen sehr vorteilhaft sein. Organische in Wasser dispergierte Nanopartikel finden zwar in der Pharmazie, Kosmetik, Pflanzenschutz und Ernährung immer mehr Anwendung, jedoch sind beispielsweise Lösungsmittelreste noch vorhanden, die sich auf die jeweiligen Anwendungen nachteilig auswirken können. Zu dieser Problematik finden z.Z. intensive Forschungen statt [3]. Da die Silicatpartikel auf nasschemischen Weg in einem Wasser-Ethanolgemisch synthetisiert werden, besitzen sie naturgemäß keine Tenside, Stabilisatoren, usw. Zusätzlich ist eine multifunktionelle Oberfläche vorhanden, die je nach Anforderung modifiziert werden kann – sei es beispielsweise mit Carboxylfunktionalitäten (als Biolinker) oder Fluororganylgruppen (Beeinflussung der physikalisch- chemischen Oberflächeneigenschaften).

#### 2. Erfindung

Gegenstand der Erfindung sind Partikel, die erhalten wurden durch Hydrolyse und Kondensation von Sol-Gel-Vorstufen von Elementen der Gruppen 1-15, vorzugsweise Si (Ti, Zr, Al) in Kombination mit hydrophoben Sol-Gel-Vorstufen wie beispielsweise perfluorierte-alkyl-trialkoxysilane (3,3,3-Trifluoropropyltrimethoxysilan) oder Bis(trialkoxysilylalkyl)benzole (Bis(trimethoxysilylethyl)benzol).

#### 3. Beschreibung

Die Partikel bestehen vorzugsweise aus einem anorganisch-oxidischen Kern. Dieser kann homogen oder heterogen (Kern-Schale-Typ (2), Rosinenkuchen-Modell (3)) aufgebaut sein. Kombinationen der beschriebenen Partikeltypen sind auch möglich.



Die Herstellung der Partikel erfolgt mittels des Sol-Gel-Verfahrens. So können die Kerne von Partikeltyp 1, 2 und 3 in Anlehnung an den Stöber-Prozess, Emulsions- bzw. Aersolverfahren dargestellt werden.

Durch die Modifizierung des Partikelinneren ist es möglich neben Lanthanoid-Komplexen sowohl hydrophobe als auch oleophobe Moleküle / Komplexe in die ursprünglich hochpolare oxidische Matrix zu bringen. Die Partikeloberfläche kann beispielsweise mit Carboxyl-, Amino-, Mercapto-, Epoxy- oder Aldehydgruppen funktionalisiert werden. Dies kann u.a. durch Silanisierung erfolgen. Die Partikelgröße kann mit enger Größenverteilung vom Nano- bis Mikrometerbereich eingestellt werden.

#### 4. Beispiele

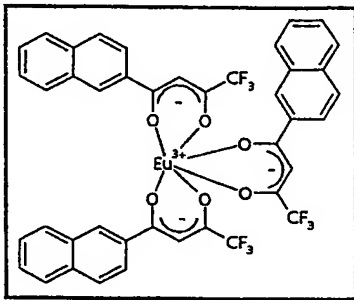
##### Beispiel 1:

Zu einer temperierten Lösung aus 61 ml Wasser, 40 ml Ethanol und 14 ml Ammoniumhydroxidlösung werden sukzessive 20 ml TEOS und eine Mischung aus 20 mg Tris-[4,4,4-Trifluoro-1-(2-naphthyl)-1,3-butan-2,3-dion]-Eu(III), 1 ml Dichlormethan und 0,25 ml 3,3,3-Trifluoropropyltrimethoxysilan, gegeben. Die Reaktionsmischung wird 4 Stunden bei 30 °C gerührt und weitere 15 Stunden bei Raumtemperatur.

Die erhaltene Dispersion wird durch mehrere zentrifugative Waschzyklen gereinigt. Dabei wird der jeweilige Überstand mittels UV-Vis- und Fluoreszenzspektroskopie auf Anteile des Komplexes überprüft.

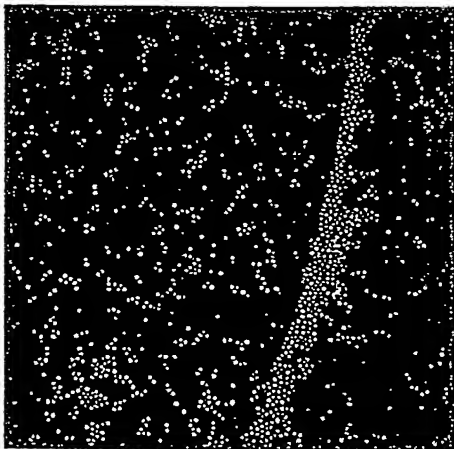
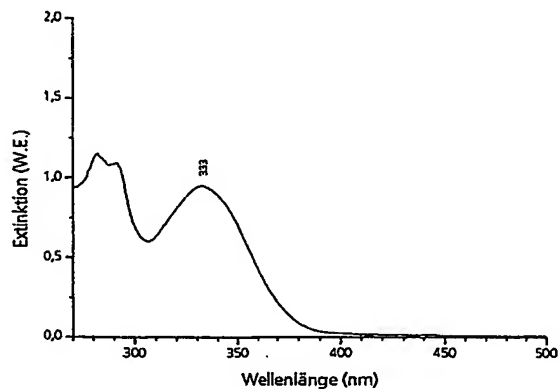
CharakterisierungStrukturformel

Tris-[4,4,4-Trifluoro-1-(2-naphthyl)-  
1,3-butandion]-Eu(III)

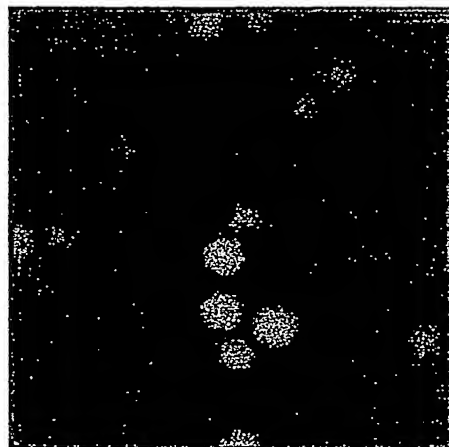
UV-VIS Spektrum

(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH; 1:1)

$\lambda_{\text{Abs.}} = 333 \text{ nm}$



TEM-Aufnahme von Eu3  
Vergrößerung = 6300 x



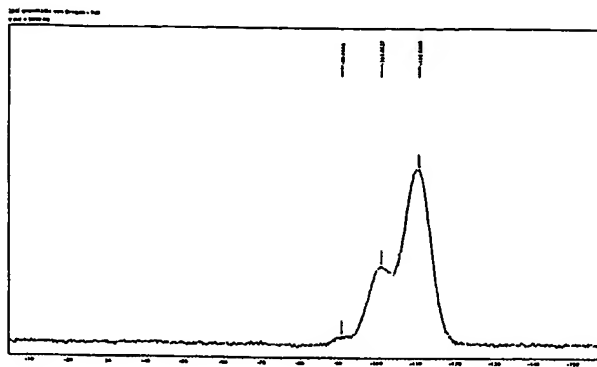
TEM-Aufnahme von Eu3  
Vergrößerung = 63000 x

4.9  $\mu\text{mol/g}$  SiO<sub>2</sub> Eu(NTA)<sub>3</sub> - Komplex in 130-158 nm SiO<sub>2</sub>-Partikeln

RFA: berechnete Menge an Europium in Eu3 = 0.07%

RFA: gefundene Menge an Europium in Eu3 = 0.05%

### MAS $^{29}\text{Si}$ -Festkörper-NMR Spektrum von $\text{Eu}_3/\text{SiO}_2$

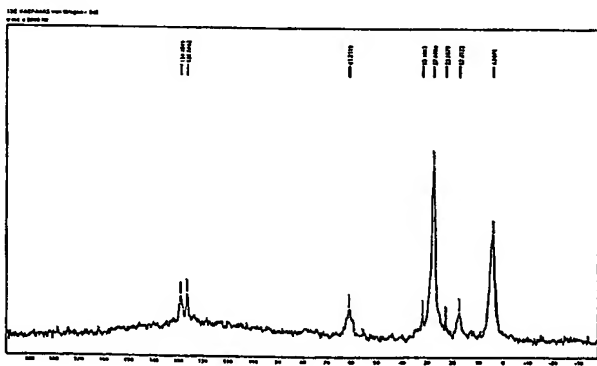


#### Interpretation

Integration liefert:

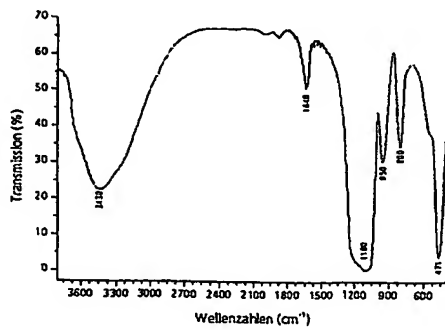
- a) 110.7 ppm;  $\text{Q}^4$ -Gruppen, 70.54 %
- b) 101.1 ppm;  $\text{Q}^3$ -Gruppen, 27.24 %
- c) 91.0 ppm;  $\text{Q}^2$ -Gruppen, 2.21 %

### VACP/MAS $^{13}\text{C}$ -Festkörper-NMR-Spektrum von $\text{Eu}_3$



#### Interpretation

- a) 129.4 / 126.7 ppm; arom.  $\text{C-H}$
- b) 61.2 ppm;  $\text{CH}_2\text{-OH}$
- c) 27.6 ppm;  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CF}_3$
- d) 17.4 ppm;  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$
- e) 4.5 ppm;  $\text{Si-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CF}_3$



### IR-Spektrum

Eu<sub>3</sub>/SiO<sub>2</sub> als KBr-Preßling

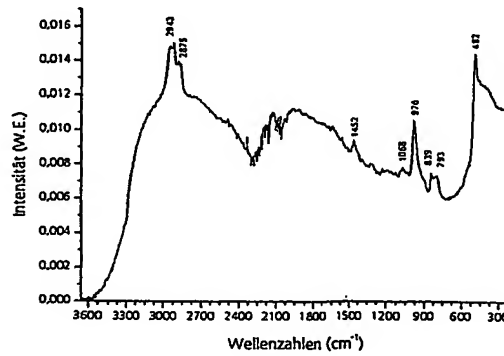
$$\nu(\text{O-H}) = 3430 \text{ cm}^{-1}$$

$$\delta(\text{H}_2\text{O}) = 1640 \text{ cm}^{-1}$$

$$\nu(\text{Si-O-Si}) = 1100 \text{ cm}^{-1} \text{ (as)}$$

$$\nu(\text{Si-O-Si}) = 800 \text{ cm}^{-1} \text{ (sym)}$$

$$\delta(\text{Si-O-Si}) = 471 \text{ cm}^{-1} \text{ (?)}$$



### Raman Spektrum

Feststoffprobe von Eu<sub>3</sub>/SiO<sub>2</sub>

$$\nu(\text{C-H})_{\text{aliph.}} = 2943, 2875 \text{ cm}^{-1} \text{ (as)}$$

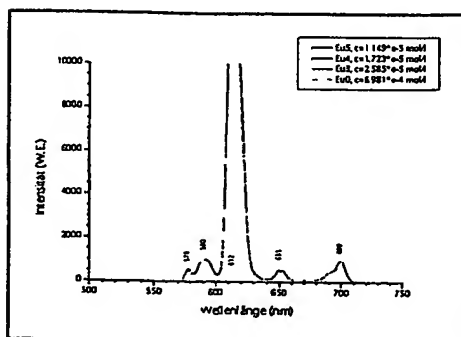
$$\delta(\text{CH}_3, \text{CH}_2) = 1452 \text{ cm}^{-1}$$

$$\nu(\text{Si-O-Si}) = 1068 \text{ cm}^{-1} \text{ (as)}$$

$$\nu(\text{Si-O-Si}) = 839, 793 \text{ cm}^{-1} \text{ (sym)}$$

$$\delta(\text{Si-O-Si}) = 482 \text{ cm}^{-1}$$

## Fluoreszenzspektrum von Eu(NTA)<sub>3</sub>



### Emissionsbanden

$$\lambda_{\text{em}} = 578 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{em}} = 612 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{em}} = 651 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{em}} = 699 \text{ nm}$$

### Zuordnung\*

$$^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$$

$$^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$$

$$^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$$

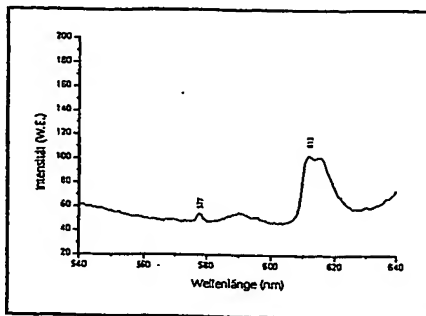
$$^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_3$$

$$^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_4$$

$$\lambda_{\text{exc.}} = 333 \text{ nm}$$

\*UL: R. Reisfeld et al., J. of Alloys and Compounds 300-301 (2000), 147-151.

### Fluoreszenzspektrum von Eu<sup>3</sup> Partikeln



Vermessung einer Feststoffprobe von Eu<sup>3</sup>, welche auf einen Objektträger fixiert wurde.

Einstellungen:

Leistung = 950 mV, Spaltweiten = EX/EM=10/1

Lichtquelle = Xenonlampe

$\lambda_{exc} = 333 \text{ nm}$

$\lambda_{em} = 613 \text{ nm}$

### 5. Anwendung

Beeinflussung von Brechungsindex und Dichte von SiO<sub>2</sub>-Partikel. Durch hydrophobe (fluorierte) Umgebung in den Silicatpartikeln zeigen beispielsweise Fluorophore kein Quenching, das auf Wasser zurückzuführen ist.

Partikel können nach Oberflächenfunktionalisierung mit Antikörpern gekoppelt werden. Besonders geeignet ist eine bioanalytische Anwendung in Form von Teststreifen-Assays. Die Einarbeitung in beliebige Polymermatrices ist möglich (z.B. ORMOCER®). Andere Anwendungsbereiche: Pigmente, Tinten, Sicherheitsmarker, Additive.

### 6. Literatur

- [1] H. Kawaguchi, *Prog. Polym. Sci.* **2000**, 25, 1171-1210.
- [2] J. Kron, K. Rose, K.-J. Deichmann, G. Schottner, K.-H. Haas, 2. Wörlitzer Workshop: Funktionelle Schichten – Adhäsive und antiadhäsive Oberflächen (Fördergemeinschaft „Dünne Schichten“ e.V.), Tagungsband **2000**.
- [3] D. Horn, J. Rieger, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 4460-4492.

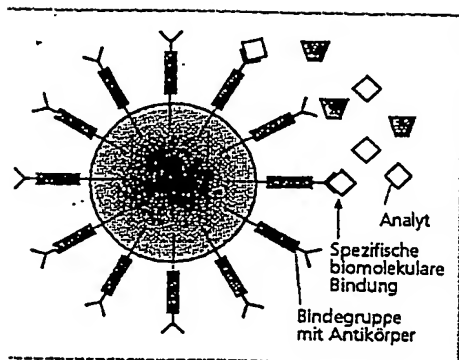


Bild 1  
Schematische Darstellung eines homogen gefärbten Nanopartikels, an der Oberfläche mit biomolekularen Bindeguppen ausgerüstet

### Ausgangssituation

Biosensoren zum chemischen Nachweis von Biomolekülen wie Antigenen oder Haptenen, die spezifisch für ein bestimmtes Krankheitsbild sind, stellen eine wichtige Anwendung in der medizinischen Diagnostik und Bioanalytik dar. Solche Sensoren können z. B. in Form chromatographischer Teststreifen realisiert werden, die auf ein Vlies aufgebraute Detektorreagenzien enthalten.

Dies können spezielle, an ihrer Oberfläche mit spezifischen Anbindungspartnern (z. B. Antikörper oder DNA-Fragmente) ausgerüstete Nanopartikel sein, die ausschließlich an den gesuchten Stoff binden. Die Partikel tragen Signalgruppen, sogenannte Marker, die über einfache analytische Methoden, beispielsweise über UV-VIS-Absorptions- oder Fluoreszenzmessung, sichtbar gemacht werden können. Nach Aufbringung der zu untersuchenden Blutprobe liefern die Partikel bei Anwesenheit des gesuchten Stoffs ein farbiges oder fluoreszentes Signal.

### Organisch modifizierte Silicat-Nanopartikel als Fluoreszenzmarker

Das Fraunhofer ISC entwickelt neuartige, organisch-modifizierte Silicat-Nanopartikel, die besonders vorteilhaft in Biosensoren eingesetzt werden können. Die Partikel werden über ein nass-chemisches Niedertemperaturverfahren hergestellt, das es erlaubt, organische Farbstoffe oder Fluorophore homogen in Silicatpartikel einzubringen und sie dort chemisch zu verankern, ohne ihre optischen Eigenschaften zu verändern.

Die organischen Farbstoffmoleküle werden hierzu chemisch modifiziert, so dass sie sich in die anorganische Silicat-

struktur der Partikel kovalent einbauen lassen. Biomoleküle können nicht in die Partikel eindringen und die Eigenschaften der Chromophore somit nicht beeinflussen.

Eine große Anzahl organischer Absorptions- und Fluoreszenzfarbstoffe kann je nach Anforderung eingesetzt werden. Die gefärbten Partikel können optional mit einer weiteren (ungefärbten) Silicatschale versehen oder für die Anbindung von Biomolekülen modifiziert werden. Hierzu werden in einer Monolage spezielle bifunktionelle Moleküle aufgebracht, die einerseits fest an der silicatischen Oberfläche verankert und andererseits mit dem biologischen Bindemolekül verknüpft werden. Bild 1 zeigt schematisch den Aufbau eines solchen Partikels.

Die transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme in Bild 2 zeigt kugelförmige, im Durchschnitt 150 nm durchmessende, fluoreszente und oberflächenmodifizierte Partikel mit sehr enger Größenverteilung.

### Kundennutzen

Die nanopartikulären Fluoreszenzmarker können für verschiedenste Anwendungen in der Chemo- und Bioanalytik eingesetzt werden und stellen eine hochstabile Alternative zu Latexpartikeln dar. Aufgrund der Vielseitigkeit des zugrunde liegenden Herstellungsverfahrens können die Partikel je nach Kundenanforderung maßgeschneidert werden und besitzen im Vergleich zu



über andere Verfahren gefärbten Partikeln deutliche Vorteile.

Die Teilchengröße kann im Bereich zwischen ca. 100 und 800 nm variiert werden. Bedingt durch den Herstellungsprozess zeigen die Nanopartikel hohe Farbstoffgehalte, aber keinerlei Farbstoffblutung. Sie können leicht aufgereinigt, redispergiert oder gefriergetrocknet werden und zeichnen sich durch exzellentes Laufverhalten auf Cellulose-Vliesen aus.

Die Oberfläche der Partikel kann mit einer Vielzahl von funktionellen Gruppen oder biomolekularen Kopplungsgruppen versehen werden. Wegen der erreichbaren hohen Empfindlichkeiten und der fehlenden Strahlenbelastung besitzt das System darüber hinaus große Vorteile gegenüber radioaktiven Markierungsreagenzien.

#### Projektpartner

#### Projektpartner

Die vorgestellten Arbeiten werden im Rahmen eines durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Vorhabens in Kooperation mit dem Partner Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, durchge-

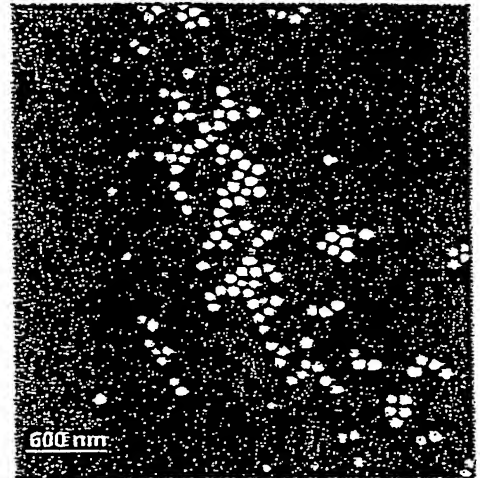


Bild 2  
Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von fluoreszenten Nanopartikeln

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**